

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

SAMOINKOMPATIBILNOST U KRITOSJEMENJAČA
SELF-INCOMPATIBILITY IN ANGIOSPERMS

SEMINARSKI RAD

Alan Budisavljević
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. SUSTAVI AUTOSTERILNOSTI	3
3. GAMETOFITSKA SAMOINKOMPATIBILNOST	6
3.1. S-RNAZNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI POMOĆNICA	7
3.1.1. ŽENSKA DETERMINANTA S-RNAZA	7
3.1.2. MUŠKA DETERMINANTA SFL/SFB	8
3.1.3. MOLEKULARNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI <i>Solanaceae</i> ..	8
3.2. KASKADNI Ca^{2+} MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI MAKOVA	12
3.2.1. ŽENSKA DETERMINANTA PrsS	12
3.2.2. MUŠKA DETERMINANTA PrPS	12
3.2.3. MOLEKULARNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI <i>Papaveraceae</i> ..	13
3.3. MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI TRAVA	15
4. SPOROFITSKA SAMOINKOMPATIBILNOST	17
4.1. MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI HOMOMORFNOG TIP U PORODICI KRSTAŠICA	18
4.1.1. ŽENSKA DETERMINANTA SRK	18
4.1.2. MUŠKA DETERMINANTA SCR/SP11	19
4.1.3. MOLEKULARNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI <i>Brassicaceae</i>	19
4.2. HETEROMORFNI TIP MEHANIZMA AUTOSTERILNOSTI U PORODICI JAGLACA	21
5. OSTALI SUSTAVI SAMOINKOMPATIBILNOSTI	23
5.1. KRIPTIČNA SAMOINKOMPATIBILNOST	23
5.2. KASNA OVARIJSKA SAMOINKOMPATIBILNOST	23
6. LITERATURA	25
7. SAŽETAK	30
8. SUMMARY	31

1. UVOD

Kritosjemenjače (podrazred *Magnoliidae*, *Magnoliophyta*, *Angiospermae*) najraznolikija su i evolucijski najodvedenija skupina kopnenih biljaka. Jedna od najznačajnijih karakteristika koja odvaja kritosjemenjače od svih ostalih kopnenih biljaka razvoj je složenog cvijeta. Zbog te apomorfne osobine danas su kritosjemenjače najzastupljenija skupina biljaka na kopnu s opisanih 440 porodica i oko 260 000 poznatih vrsta (95% svih vrsta kopnene flore) (Nikolić, 2013a). Cvijet (lat. *anthium*) kritosjemenjača kratki je dio izdanka koji nosi organe namijenjene spolnoj reprodukciji. S obzirom na to da se tučak i ciklus prašnika najčešće nalaze neposredno u blizini jedan drugoga postavlja se pitanje na koji način biljka s dvospolnim cvijetom izbjegava oplodnju vlastitim polenom.

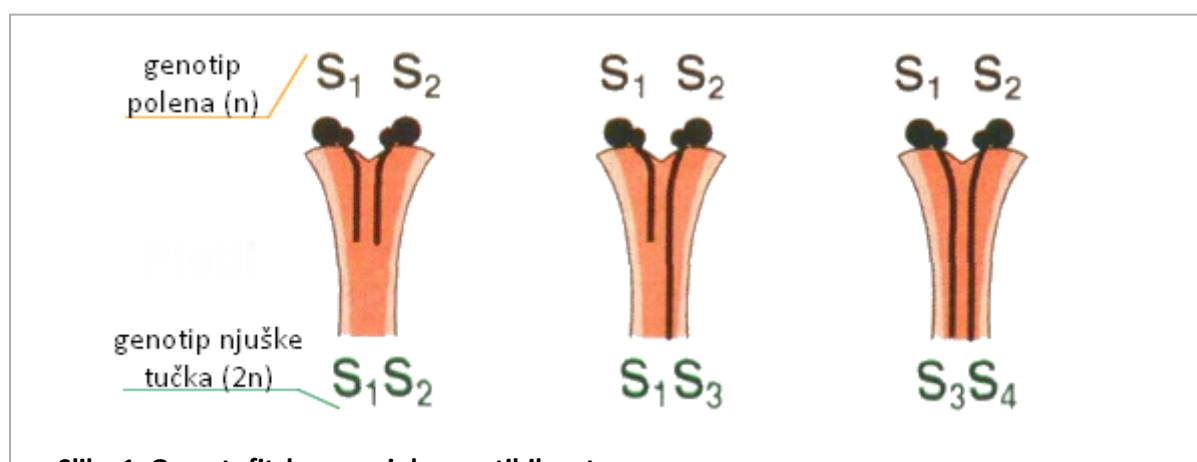
Mehanizam samoinkompatibilnosti (SI) jedan je od najvažnijih mehanizama koje koriste mnoge cvjetajuće biljke kako bi isključile mogućnost samooplodnje koja je evolucijski nepovoljna zbog posljedičnog smanjenja genetičke raznolikosti. Klasična genetička istraživanja otkrila su da je samoinkompatibilnost u kritosjemenjača kontrolirana najčešće jednim genskim lokusom multialelnog tipa nazvanim S-lokus. U slučaju da polen nosi isti S-alel kao i njuška tučka, rast polenove mješine bit će inhibirana, a oplodnja zaustavljena. Postoje više sustava samoinkompatibilnosti među kojima se ističu dva najčešća primjera – gametofitska (GSI) i sporofitska (SSI) samoinkompatibilnost.

Mehanizam kojim geni S-lokusa postižu autosterilnost predmet je istraživanja znanstvenika već više od 30 godina te je otkriveno da su razne porodice biljaka (npr. *Brassicaceae*, *Papaveraceae*, *Poaceae*) konvergentnom evolucijom razvile svojstvene mehanizme gametofitske tj. sporofitske samoinkompatibilnosti. Evolucija tih mehanizama diskutabilna je tematika koja pretpostavlja da je rana pojava SI-a doprinijela velikoj raznolikosti i time postavila temelj dominacije kritosjemenjača još u geološkom razdoblju Krede (Whitehouse, 1950). No, zbog izuzetno divergentnih mehanizama i među bliskim srodnicima upitni je trenutak nastanka, tj. gubitka autosterilnosti tijekom evolucije. U prilog ranom razvoju sustava SI-a govore istraživanja na bazalnoj porodici *Trimeniaceae* (ANITA porodice) (Bernhardt i sur., 2003) i arhetipnoj porodici *Winteraceae* (Sage i Sampson, 2003).

Cilj ovog rada je prikazati dosadašnje spoznaje u razumijevanju genetičke, botaničke, fiziološke, biokemijske i evolucijske pozadine koje obilježavaju sustav SI-a u kritosjemenjača.

2. SUSTAVI AUTOSTERILNOSTI

Gametofitska samoinkompatibilnost (GSI) jedan je od osnovnih sustava SI-a prisutan u *Angiospermae*. Fenotip autosterilnosti determiniran je muškim gametofitom, tj. postojanjem određenog S-alela u polenovom zrnu (Sl. 1.). U mehanizmu GSI nakon interakcije polena i njuške tučka inhibicija se događa u određenoj fazi rasta polenove mješinice. Mehanizam GSI je zamijećen kod mnogih porodica isključivo homomorfne građe kao što su npr. porodica pomoćnica (*Solanaceae*), ružovki (*Rosaceae*) i makova (*Papaveraceae*) (Franklin i sur., 1995).

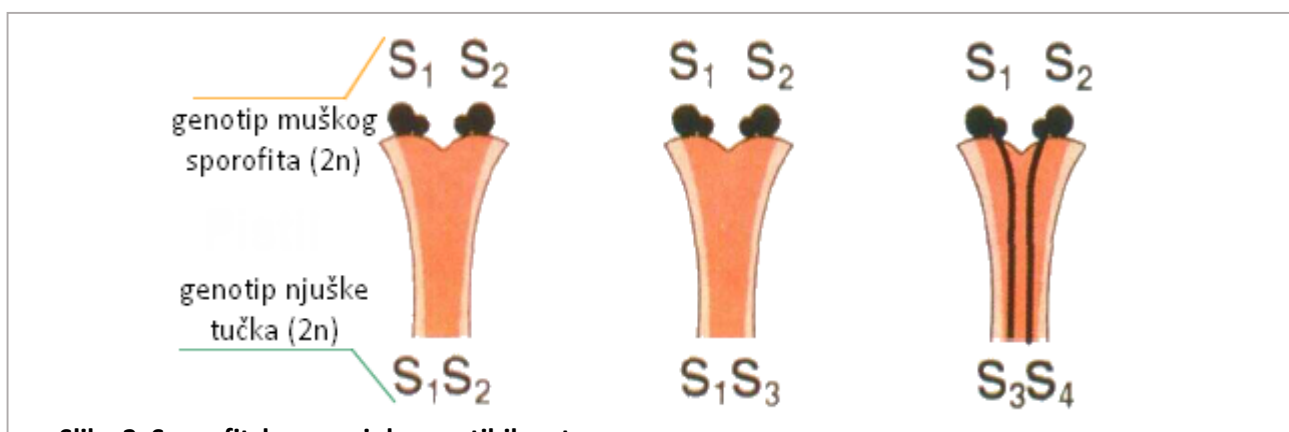


Slika 1. Gametofitska samoinkompatibilnost

Roditeljska biljka polena genotipa je S_1S_2 i prilikom toga stvara polenovo zrno haplotipa sa S_1 -alelom ili sa S_2 -alelom. Ukoliko se S-alel u polenu podudara sa S-alelom njuške tučka, rast polenove mješinice bit će inhibiran (prikaz prilagođen iz Newbigin i sur., 1993).

Drugi sustav u kojem je fenotip autosterilnosti determiniran u sporofitnom diploidnom tkivu koji proizvodi polen – polenovnici (anteri) nazivamo **sporofitska samoinkompatibilnost (SSI)**. Prilikom razvoja polena u anteri tkivo tapetuma ulaže proteine u polenovu vanjsku ovojnicu (eksinu). Takvi proteini prepisani su iz informacije oba S-alela roditeljskog sporofita. Inhibicija se u ovom slučaju događa odmah na dodirnoj stigmatskoj površini tučka (Sl. 2.), a određeni S-aleli međusobno su u dominantno-recesivnom odnosu. Zabilježene porodice koje kao mehanizam koriste SSI su krstašice (*Brassicaceae*), glavočike (*Asteraceae*), breze (*Betulaceae*), karanfili (*Caryophyllaceae*), *Convolvulaceae*, *Sterculiaceae* i *Polemoniaceae*. Također, SSI je zamijećen i u porodicama *Passifloraceae* i *Malvaceae* (Goodwillie, 1997; Hiscock i McInnis, 2003; Suassuna i sur., 2003; Hiscock i Tabah, 2003).

Primijećeno je da postoji korelacija između SSI-i tj. GSI-i i određenih morfoloških karakteristika koje mogu poslužiti kao smjernica za predviđanje sustava samoinkompatibilnosti u porodica gdje nemamo dovoljno genetičkih istraživanja. Tako biljke s trostaničnim polenom (druga mitotska dioba događa se prije interakcije polena i njuške tučka) i suhom njuškom tučka imaju sustav SSI-a, dok su dvostanični polen i vlažna njuška tučka češće povezani GSI-om. (Brewbaker, 1957; Tangmitcharoen i Owens, 1997; Heslop-Harrison i Shivanna, 1977). Postoje određena odstupanja od navedenog pravila gdje se ističu porodice *Poaceae* i *Papaveraceae* (Tab. 1.).



Slika 2. Sporofitska samoinkomaptibilnost

Roditeljska biljka stvara polenovo zrno s inkorporiranim proteinima eksprimiranih od strane svojeg diploidnog genotipa (S_1S_2). Do oplodnje će doći isključivo u slučaju kada su svi S-aleli njuške tučka drugačiji od S-alela roditeljske biljke polena (prikaz prilagođen iz Newbigin i sur., 1993).

Danas su najdetaljnije istražena tri molekularna mehanizma (Tab. 1.) koja se temelje na sustavima GSI i SSI. Svim mehanizmima zajednička je važnost S-lokusa. Osnova samoinkompatibilnosti je u različitoj genskoj ekspresiji istog S-alela u muškom i ženskom spolnom organu. Ovisno u kojem su tkivu proteini translatirani, dijelimo ih na muške ili ženske determinante autosterilnosti. Takvi proteini upareni su svojim djelovanjem te, ukoliko se dogodi njihova međusobna interakcija, pokreće se mehanizam autosterilnosti. Iako većina biljaka sa sustavom SI dijeli ovakva opća svojstva, proučavane determinante između porodica izuzetno se razlikuju što upućuje na evolucijsku hipotezu da se mehanizam samoinkompatibilnosti razvio neovisno i više puta tijekom evolucije kritosjemenjača.

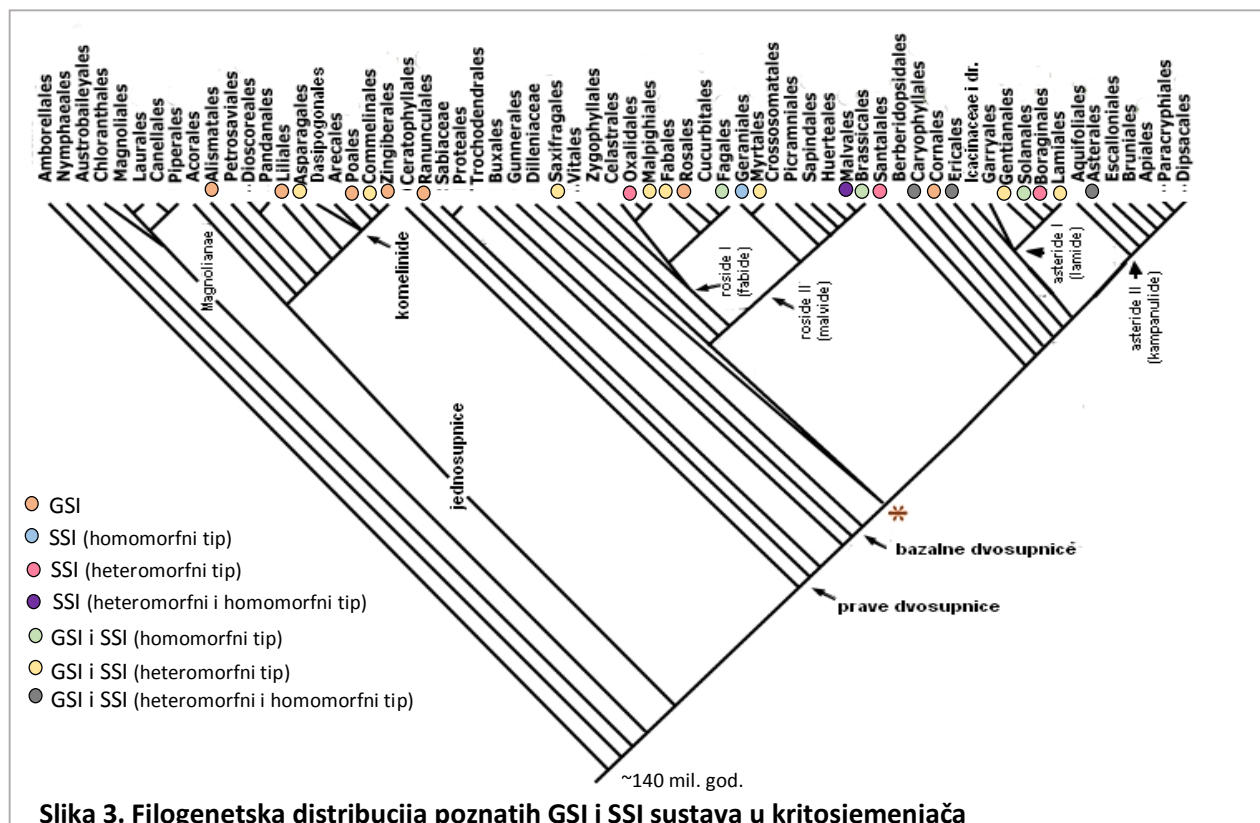
Mnogi mehanizmi SI-i nisu u potpunosti objašnjeni (npr. porodica *Poaceae*), dok se za većinu porodica samo nagađa o mogućem molekularnom mehanizmu autosterilnosti. U ovom polju trenutno se vrše intenzivna istraživanja kako bi se odredili nepoznati elementi i točne determinante autosterilnosti.

Tablica 1. Morfološke karakteristike i produkti genske ekspresije S-lokusa po porodicama u kojima su pronađeni.

	GSI			SSI
Porodica	<i>Solanaceae</i>	<i>Papaveraceae</i>	<i>Poaceae</i>	<i>Brassicaceae</i>
Genetička kontrola SI-a	Polen (n)	Polen (n)	Polen (n)	Roditelj polena (2n)
Njuška tučka	Vlažna	Suha	Suha	Suha
Polen	Dvostanični	Dvostanični	Trostanični	Trostanični
Inhibicija oplodnje	Na 1/3 polenove mješnice	Na površini njuške tučka	Na površini njuške tučka	Na površini njuške tučka
Brzina reakcije	Spora	Brza	Brza	Brza
Ženski determinant	S-RNaza	S protein/PrsS	?	SRK
Muški determinant	SLF/SFB	PrpS	?	SCR/SP11
Mehanizam	RNA degradacija	Ca ²⁺ signalna kaskada	?	Signalna kaskada

3. GAMETOFITSKA SAMOINKOMPATIBILNOST

Sustav GSI jedan je od najzastupljenijih mehanizama cvjetnjača. Poligenska distribucija GSI-i u podrazredu *Magnoliidae* oslikava dominantnost ovog sustava u većini redova dvosupnica i jednosupnica (Sl. 3.).



Slika 3. Filogenetska distribucija poznatih GSI i SSI sustava u kritosjemenjača

Kladogram redova kritosjemenjača s otkrivenim sustavima GSI-i i SSI-i. Hipotetski zajednički predak središnjih eudikotiledona koji je prvi razvio S-Rnazni mehanizam prije ~112 milijuna godina označen je zvjezdicom. Dosadašnja istraživanja govore da gametofitski sustav sadrži 36 porodica, dok sporofitski posjeduje 10 (prikaz je izrađen po APGIII s informacijama iz Iglic i sur., 2008).

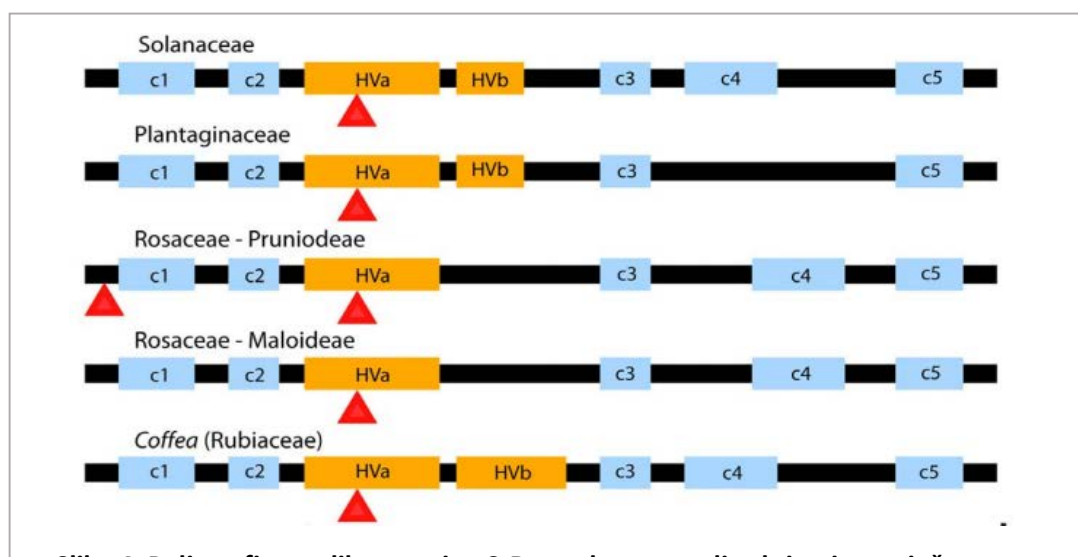
Najdetaljnije su proučena dva tipa molekularnog mehanizma GSI-i: **S-Rnazni**, karakterističan za porodice *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Plantaginaceae*, i **kaskadni Ca^{2+} ovisni sustav** reprezentativan za porodicu *Papaveraceae* (McClure i Franklin-Tong, 2006). S obzirom na to da su ova dva mehanizma međusobno drastično različita, pretpostavka je da se GSI pojavio u evoluciji barem dva puta. Filogenetička istraživanja genske sekvence S-lokusa u S-Rnaznom tipu ukazuju na to da je GSI začetnički mehanizam autosterilnosti za 75% dvosupnica (Allen i Hiscock, 2008). U nekim redovima taj se mehanizam sekundarno gubi, a kod nekih se naknadno razvija drugi sustav SI-a (SSI). Iako se evolucijski gledano kaskadni mehanizam razvio prije S-Rnaznog, Ca^{2+} mehanizam je zbog vrlo ranog odvajanja reda *Ranunculales* ostao izoliran i po današnjim istraživanjima specifičan za porodicu makova.

3.1. S-RNAZNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI POMOĆNICA

S-RNazni molekularni mehanizam autosterilnosti temeljen je na sustavu GSI i među prvima je otkriven u porodici pomoćnica (u rodovima *Nicotiana*, *Petunia*, *Lycopersicon*, *Solanum*) pa se zbog toga ovaj mehanizam često u literaturi naziva *Solanaceae*-tip. Ostale istraživane porodice ovog mehanizma su *Rosaceae* (u rodovima *Malus*, *Prunus*, i *Pyrus*), *Plantaginaceae* (*Antirrhinum* i vjerojatno *Veronica*) (Kao i Tsukamoto, 2004; Scalone i Albach, 2014) i u porodici *Rubiaceae* (Nowak i sur., 2011).

3.1.1. ŽENSKA DETERMINANTA S-RNAZA

Molekularni mehanizam temelji se na specifičnoj ribonukleaznoj aktivnosti glikoproteina; ženske determinante nazvane **S-RNaza** prvi put otkrivene prije tridesetak godina u vrsti *Nicotiana glauca* (Bredemeijer i Blaas, 1981; McClure i sur., 1989). S-RNaze su lokalizirane u gornjem dijelu tučka gdje reagiraju sa S-haplotipom iz polenovog zrnca. Funkcionalna domena za autosterilnost nije u šećernom dijelu proteina već u njegovoj aminokiselinskoj okosnici. Protein se poprilično razlikuje između porodica koje dijele isti mehanizam GSI-i, no otkriveno je da su određene regije proteina većinom sačuvane, što govori u prilog teoriji zajedničkog evolucijskog pretka (Sl. 4.). Činjenica da S-RNaze oba S-alela (npr.



Slika 4. Polimorfizam glikoproteina S-Rnaze kroz porodice kritosjemenjača

S-RNaze sadrže pet visoko sačuvanih regija (c1-c5) koje su u većini porodica kroz evoluciju ostale prisutne, i dvije hiper-varijabilne regije (HVa i HVb). Dva histidina i lizin u C2 i C3 regiji nose katalitičku ribonukleaznu aktivnost, a HVa i HVb specifičnost za odgovarajuću mušku determinantu (SLF/SFB). Crveni trokuti označavaju mjesto introna (Nowak i sur., 2011).

S₁S₂ ženski sporofit proizvodi S₁ i S₂-RNazu) ulaze unutar bilo koje (ne/kompatibilne) polenove mješinice važna je spoznaja za hipotetski model molekularnog mehanizma (Gray i sur., 1991; Goldraij i sur., 2006).

3.1.2. MUŠKA DETERMINANTA SLF/SFB

Za razliku od ženske determinante koja je bila lako i brzo otkrivena, muška determinanta indentificirana je tek nedavno. Nazvana je **S-lokus F-box protein (SLF)**, tj. **SFB** u porodici *Rosaceae* (Sijacic i sur., 2004).

Perpleksna je spoznaja da struktura SLF proteina nema istaknuti polimorfizam, tj. međusobnom usporedbom SLF proteina kodiranih različitim alelima otkriveno je da njihove razlike nisu veće od 1-3%, dok S-Rnaze u istoj porodici razlikuje 47-62% aminokiselina (Sims, 2012). Uočena je i činjenica da SFL proteini nemaju kompaktnu hipervarijabilnu regiju koja nosi specifičnost već su varijabilne aminokiseline smještene po cijelom proteinu. Navedeni dokazi kompliciraju filogenetičku sliku mehanizma jer se pretpostavlja kako su se muška i ženska determinanta razvijale koevolucijom.

3.1.3. MOLEKULARNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI *Solanaceae*

U razmatranju mehanizma SI-a u porodici pomoćnica možemo postaviti dva pitanja:

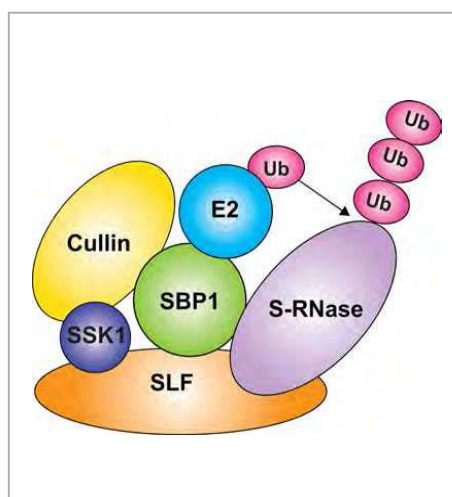
- (a)** Kako ženska determinanta potiče mehanizam autosterilnosti?
- (b)** Kako se sprječava S-RNazna aktivnost u kompatibilnoj polenovoj mješinici?

Na prvo pitanje predložen je citotoksični model prema kojem S-RNaze utječu na inhibiciju proizvodnje proteina u inkompatibilnoj polenovoj mješinici. S obzirom na to da imaju ribonukleaznu aktivnost, pretpostavlja se da utječu na degradaciju ribosoma, a time i na prekid mašinerije za proizvodnju proteina, što obustavlja metabolizam i rast polenove mješinice. Navedena hipoteza nije u potpunosti prihvaćena zbog nekih kontradiktornih istraživanja kao npr. istraživanje transmisijским elektronskim mikroskopom koja pokazuju intaktne poliribosome nakon inhibicije polenove mješinice S-RNazama (Wallis i Han, 1998).

Drugi problem svoje moguće rješenje pronalazi preko dvaju predloženih modela. Model **SCF^{SLF} ubikvitinacije** i model **konfiskacije** (kompartimentizacije). Oba modela kao osnovu podrazumijevaju ranije spomenuti citotoksični model djelovanja S-RNaza.

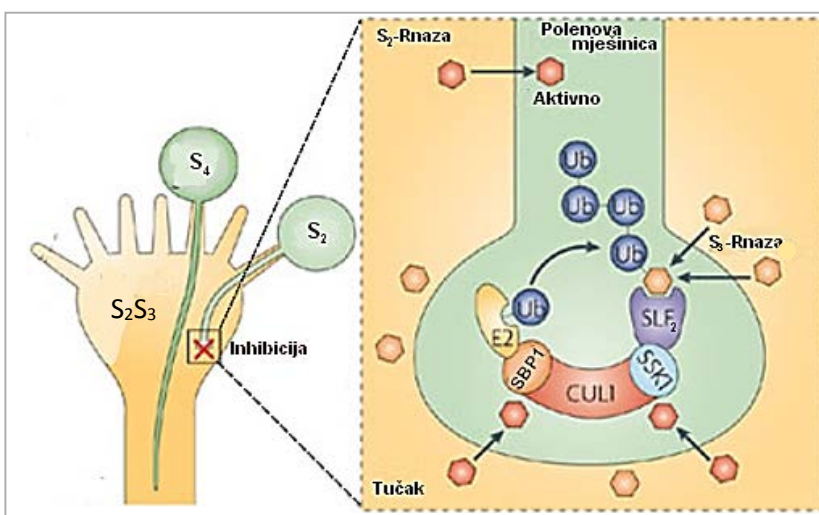
Istraživanjem proteinskih interakcija predložen je model **SCF^{SLF} ubikvitinacije**. Model funkcionira po tezi inhibicijskog modela gdje SLF/SFB utječu na inhibiciju svih S-RNaza osim svojeg alelnog para (npr. SLF₂ neće moći zaustaviti aktivnost S₂-RNaze).

SFL je otkriven kao „F-box“ protein koji sudjeluje u kompleksu za ubikvitinaciju (Sl. 5.) i prepoznat je od strane SBP1 proteina koji ima ulogu ubikvitin ligaze E3 i potiče reakciju poliubikvitinacije – obilježavanja supstrata (u ovom slučaju S-RNaze) molekulama ubikvitina radi degradacije na 26S proteosomima (Sims, 2012).



Slika 5. SCF^{SLF} ubikvitin ligaza-kompleks

SBP1 je proteinski kompleks koji provodi poliubikvitinaciju S-RNaze uz pomoć kulin i SSK1 proteina (Sims, 2012).



Slika 6. Mehanizam SCF^{SLF} ubikvitinacije

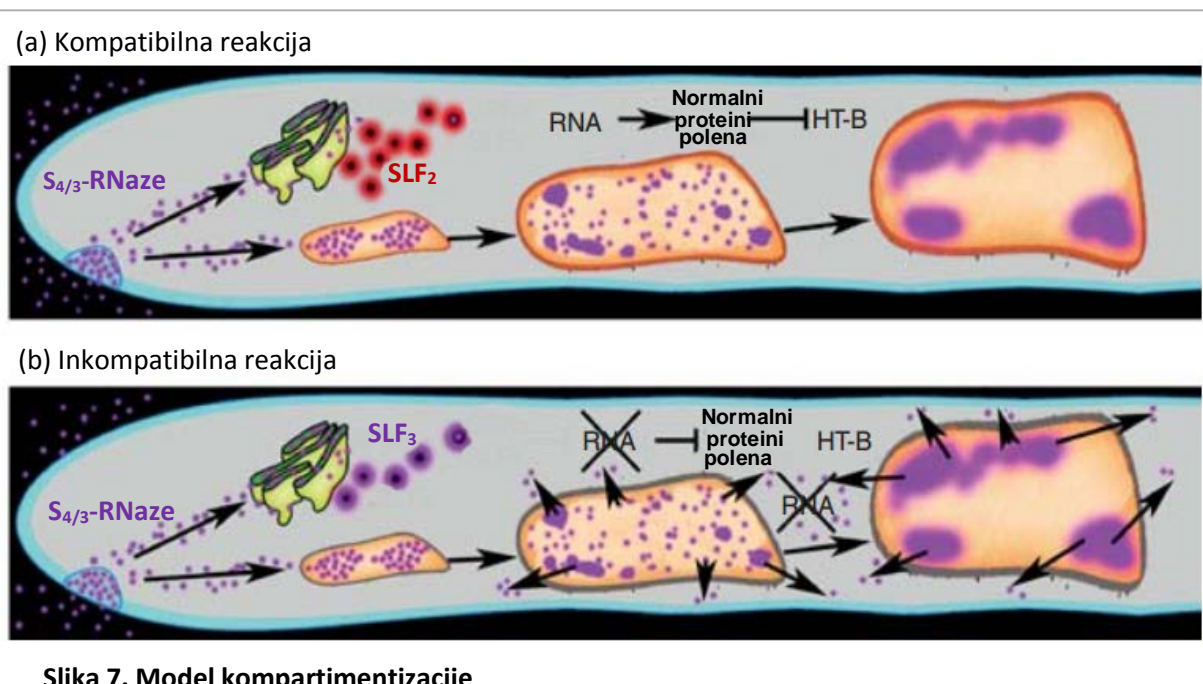
Reakcija inkompatibilnosti polena sa S₂-alelom i tučka genotipa S₂S₃. Uočljivo je da S₂-RNaza nije ubikvitinirana i time je uzrokovala inhibiciju rasta, dok je polen sa S₄-alelom nastavio svoj rast do embrionske vreće (prikaz adaptiran iz Vierstra, 2009).

Prilikom ulaska S-Rnaze u stanicu, SCF kompleks sa SLF muškom determinantom degradira ciljane S-RNaze u citoplazmi polenove mješnice (Xue i sur., 2014). Ukoliko kompleks naiđe na supstrat koji je istog alelnog tipa kao i SLF, ubikvitinacija je nemoguća i S-RNaza će uzrokovati inhibiciju rasta polenove mješnice (Sl. 6.).

Posljednja istraživanja potvrđuju ove proteinske interakcije i u porodici *Rosaceae* te je usporedbom sekvence SCF kompleksa s porodicama *Solanaceae* i *Plantaginaceae* otkrivena podudarnost što upućuje na hipotetskog zajedničkog pretka (Xu i sur., 2014).

Iako mnogi radovi pokazuju na jedinstvenu ispravnost ovog modela, model konfiskacije i dalje nije isključen, te je moguća određena kombinacija ovih dvaju modela *in vivo*.

Model kompartmentizacije (konfiskacije) drugi je predloženi model molekularnog mehanizma tipa *Solanaceae* (Sl. 7.). Najviše se temelji na radu Goldraij i sur. (2006), u kojem su uočili kako se S-RNaze pohranjuju u vrpcoliku vakuolu držanu na okupu 120K glikoproteinom i proteinom HT-B koji su porijeklom iz tkiva tučka. Protein HT-B bogat je asparaginom i aspartatom za koji se predviđa da regulira trenutak raspada vakuole. Ukoliko se mutira njegov gen, a ekspresija inhibira, sustav GSI će se zaustaviti i svi će S-haplotipovi biti kompatibilni (Puerta i sur., 2009). Primijećeno je da se u kompatibilnoj mješini događa degradacija HT-B-a (Goldraij i sur., 2006).



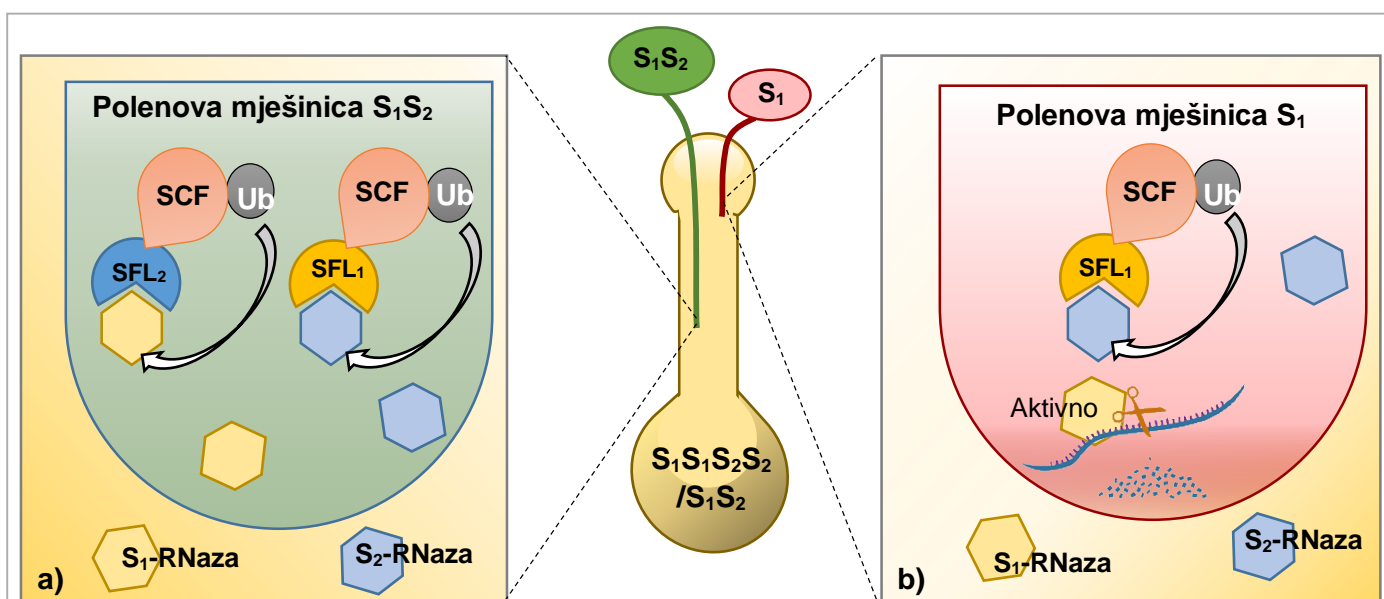
Slika 7. Model kompartmentizacije

- U kompatibilnoj reakciji polenova mješini sa S_2 -alelom raste kroz tkivo tučka S_3S_4 genotipa. S-RNaze se pohranjuju u vakuolu, a normalni proteini smanjuju koncentraciju HT-B-a u citoplazmi.
- U inkompatibilnoj reakciji polen sadrži S_3 -alel, te njegov SFL ne sprječava djelovanje ribonukleaza i time su poremećeni normalni uvjeti u stanici. Koncentracija HT-B-a u citosolu raste, vakuola se raspada i S-RNaze inhibiraju metabolizam (prikaz adaptiran iz McClure i sur., 2011).

Nedavno istraživanje gdje se navodi da inhibicijom sinteze citoskeletnih elemenata polenove mješine S-Rnaze ne mogu ući u stanicu insinuirajući na hipotezu kako S-RNaze ipak u mješinu ulaze endocitozom s vezikulama navođenim citoskeletom do goldijeva aparata, a ne preko specifičnog prenositelja (Meng i sur., 2014). Zanimljiv je zaključak kako su ova dva modela najvjerojatnije povezana. S-RNaze i ostali mali proteini tučka (120K i HT-B) ulaze endocitozom do goldijevog aparata gdje se retrogradnim transportom odvođuju u unutrašnjost

stanice formirajući vakuolu. Problematični dio ove hipoteze koji treba detaljnije proučiti točna je lokacija interakcije muške i ženske determinante. McClure i sur. (2011) navode mogućnost da određene pohranjene molekule S-RNaza izađu iz vakuole i prilikom toga mogu ostvariti interakciju s muškom determinantom. Ukoliko primijenimo ovu pretpostavku, tada S-RNaza u citoplazmi može specifično reagirati s proteinom SFL što će rezultirati interakcijom s kompleksom SCF koji će vršiti ubikvitinaciju. U inkompatibilnoj mješini ribonukleaza će ostati aktivna i time poremetiti homeostazu stanice i djelovati citotoksično na molekule mRNA ili/i rRNA. Posljedica će biti raspad vakuole i zamijećeni porast koncentracije HT-B-a.

Upitni aspekt ovog mehanizma je i u funkcioniranju poliploida gdje se u slučaju tetraploida gubi samoinkompatibilnost (Sl. 8.). Po tome sustav SI nije funkcionalan ukoliko je tučak heterozigot za S-lokus ($S_1S_1S_2S_2$) ili normalni diplod (S_1S_2), a oplodnja se vrši diploidnim polenom (S_1S_2). Unatoč tome oplodnja haploidnim polenom (S_1 ili S_2) bit će inhibirana. Navedeni slučaj možemo objasniti ubikvitinacijom gdje SFL_1 i SFL_2 eksprimirani u diploidnom polenovom zrnu mogu s kompleksom SCF obrtati nasuprotnu S-RNazu ($SFL_1 \rightarrow S_2$ -RNaza) i time inaktivirati ribonukleaznu aktivnost.



Slika 8. S-RNazni mehanizam u poliploidima

Mehanizam djelovanja tučka genotipa $S_1S_1S_2S_2$ ili S_1S_2 i diploidnog kompatibilnog polena S_1S_2 , tj. inkompatibilnog haploidnog polena S_1 .

- Uspješna ubikvitinacija oba tipa S-Rnaze koje izlučuje tučak zbog čega polenova mješinica iako ima poklopljene S-alele izbjegava SI mehanizam.
- Haploidan polen samo sa S_1 muškom determinantom ne može ubikvitinirati S_1 -RNazu i time će rast njegove polenove mješinice biti inhibiran.

3.2. KASKADNI Ca^{2+} MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI MAKOVA

Drugi istraživani gametofitski sustav samoinkompatibilnosti je kalcijev kaskadni mehanizam otkriven u porodici *Papaveraceae* (u vrsti *Papaver rhoeas*). Iz evolucijskog aspekta zanimljiva je navedena različitost mehanizma u usporedbi sa *Solanaceae* S-Rnaznim tipom čime je njegova konvergentna ekskluzivnost isključiva za red *Ranunculales*.

3.2.1. ŽENSKA DETERMINANTA PrsS

U tučku S-lokus kodira za mali hidrofilni glikoprotein (~15 kDa) nazvanim S-protein (Foote i sur., 1994) čija je nomenklatura kasnije promijenjena u **determinanta *Papaver rhoeas stigma S* (PrsS)**. Njezina aktivnost zabilježena je aktivacijom povećanja citosolne koncentracije kalcija u inkompatibilnoj polenovoju mješinici (Franklin-Tong i sur., 1993). PrsS, slično kao i S-Rnaze, ima izraženi polimorfizam. Različiti S-alelni produkti posjeduju između 51.3-63.7% sličnosti u aminokiselinskom slijedu (Takayam i Isogai, 2005), a konzervirane regije razbacane su po cijelom polipeptidu. Unatoč međusobnih razlika univerzalna im je specifična proteinska sekundarna struktura gdje aktivnost proteina ne ovisi o šećernom dijelu.

3.2.2. MUŠKA DETERMINANTA PrpS

S obzirom na to da se posljedično u stanici polenove mješinice nakon uvođenja PrsS-a događa nagli porast koncentracije kalcija, pretpostavlja se da muška determinanta mora biti membranski kanal za kalcij. Točna determinanta koja uzrokuje izričito prepoznavanje istog S-alela pronađena je tek nedavno, te je nazvana **determinanta *Papaver rhoeas polen S* (PrpS)** (Wheeler i sur., 2009). PrpS je transmembranski hidrofobni protein veličine oko 20 kDa. Sekcenviranjem je utvrđeno da sam protein nema nikakvu katalitičku domenu zbog čega je upitno na koji način ostvaruje interakciju sa ženskom determinantom. Rezultati usporedbe S-alelnih varijanta PrpS proteina ukazuje na slični polimorfizam kao i kod ženske determinante što potvrđuje pretpostavku koevolucijskog razvoja (Wheeler i sur., 2009).

3.2.3. MOLEKULARNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI *Papaveraceae*

Mehanizam autosterilnosti porodice *Papaveraceae* temeljen je na naglom ulazu izvanstaničnog kalcija koji je sekundarni glasnik aktiviran PrsS-PrpS interakcijom i kaskadno potiče niz reakcija u polenovoj mješinici (Sl. 9).

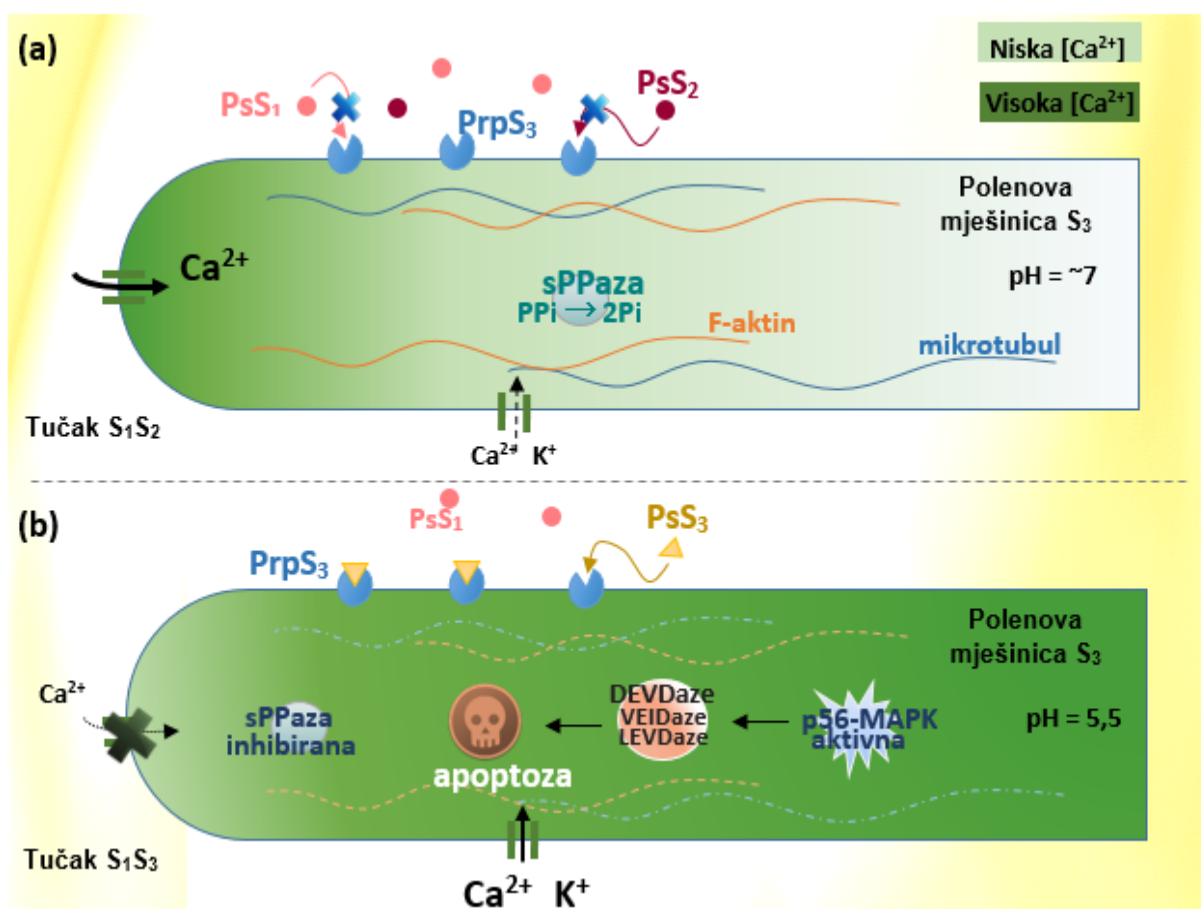
Unutar polenove mješinice kalcij se nalazi u većoj koncentraciji isključivo u apikalnom dijelu dok se u slučaju inkompatibilne polenove mješinice koncentracija kalcija i kalija naglo povećava u cijeloj citoplazmi (Wu i sur., 2011). Visoka količina kalcija potiče sljedeći niz reakcija koje kao posljedica inhibiraju rast polenove mješinice:

- (a) **Fosforilacija** proteina unutar citoplazme prvo se odvija na polenovoj **anorganskoj pirofosfatazi (sPPaza)**. Time se zaustavlja enzimatska aktivnost (hidroliza pirofosfata u dva fosfata) i obustavljaju se biosintetske reakcije koje zahtjevaju oslobađanje energije iz pirofosfata (de Graaf i sur., 2006). Drugi proces fosforilacije obuhvaća protein **mitogen aktivirajuću proteinsku kinazu (MAPK p56)** što utječe na inicijaciju apoptoze (Li i Franklin-Tong, 2008).
- (b) **Reorganizacija i depolimerizacija** citoskeletnog F-aktina i mikrotubula prilikom čega se zaustavlja rast stanice i inicira apoptoza (Snowman i sur., 2002; Poulter i sur., 2008).
- (c) **Aktivacija programirane stanične smrti** proteinima DEVDazama, VEIDazama i LEVDazama koji spadaju u skupinu enzima sličnima animalnim kaspazama. Oni pored degradacije DNA utječu i na pad pH polenove tube (Bosch i Franklin-Tong, 2007).

Uočena posljedica unutar inkompatibilne polenove mješinice je i stvaranje **reaktivnih oblika kisika** koji su sastavni dio biljne stanice u stresnim uvjetima. U ovom slučaju, svojim nastajanjem indikatori su djelovanja degradacije DNA i formiranja aktinskih proteinskih agregata raspadnutih citoskeletnih elemenata s dvama polipeptida iz obitelji aktin-vezajućih proteina (AVP proteini) (Franklin-Tong, 2014).

Posljednje istraživanje u ovom polju rađeno je na transformiranim biljkama vrste *Arabidopsis thaliana* koje eksprimiraju mušku determinantu vrste *Papaver rhoeas*. Ukoliko se prilikom oplodnje uročnjaka s dobivenim transgeničnim polenom nadoda izolirana ženska determinanta (PrsS), dobiva se identična reakcija autosterilnosti okončana staničnom smrću

kao i u vrste *P. rhoeas* (de Graaf i sur., 2012). Time su povezane dvije potpuno nesrodne biljke koje su fosilnim nalazima međusobno udaljene oko 90 milijuna godina (Nikolić, 2013b). Mehanizam SI u vrste *A. thaliana* očigledno koristi očuvane, univerzalne putove apoptoze u carstvu biljaka. Buduća istraživanja ovog fenomena nude praktičnu upotrebu mehanizma SI porodice *Papaveraceae* u lakšem dobivanju homozigotnog hibrida željenih svojstava u F_1 generaciji u agronomskim i genetičkim istraživanjima (Franklin-Tong, 2014).



Slika 9. Model SI-a u porodici *Papaveraceae*

- Transmembranski protein $PrpS_3$ u kompatibilnoj polenovoj mješnici ne može ostvariti interakciju s proteinima PsS_1 i PsS_2 time su nastavljeni normalni uvjeti koji omogućavaju nesmetani rast polenove mješnice.
- Muška determinanta $PrpS_3$ interakcijom s proteinom PsS_3 pokreće jaču propusnost Ca^{2+} i K^+ kanala na polenovoj mješnici, no uzrokuje inhibiciju apikalnog Ca^{2+} kanala. Povećana koncentracija Ca^{2+} u cijeloj stanici pokreće depolimerizaciju F-aktina i mikrotubula, potiče fosforilaciju $sPPaze$ (čime je energetski potencijal stanice smanjen i polenova mješnica prestaje rasti) i $p56-MAPK$ -a koji svojom aktivnošću aktivira proteine slične kasparazama koji potiču zakiseljavanje citoplazme i apoptozu kroz degradaciju DNA.

3.3. MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICI TRAVA

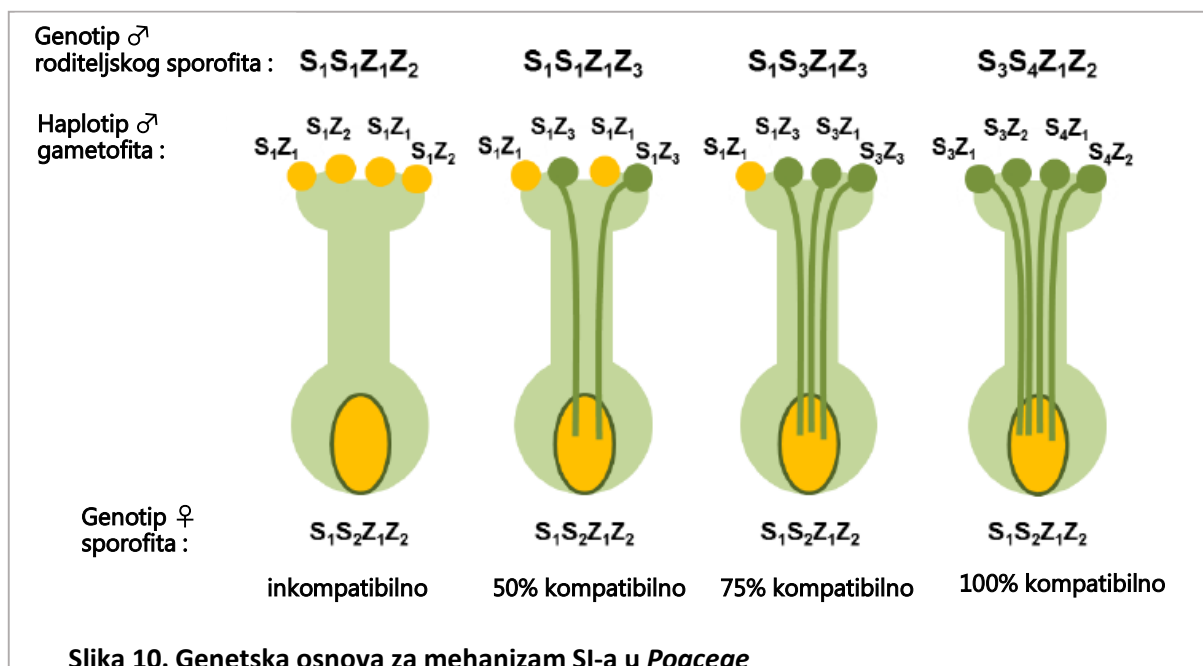
Porodica trava (*Poaceae*) kozmopolitska je porodica s oko 12 000 vrsta u oko 700 rodova, čime je jedna od najvećih porodica, treća po veličini u hrvatskoj flori s oko 359 vrsta i podvrsta.

Iako su tri najveće kulture (pšenica, kukuruz i riža) ove porodice samooplodne, barem 16 vrsta u pet potporodica (*Pooideae*, *Panicoideae*, *Chloridoideae*, *Arundinoideae* i *Bambusoideae*) imaju svojstveni mehanizam samoinkompatibilnosti (Baumann i sur., 2000.; Yang i sur., 2008).

Mehanizam SI-a u travama provodi se po sustavu GSI-a, ali ne samo s jednim S-lokusom, već s dvama (S i Z-lokus), što je izuzetak pronađen u ovoj porodici. Drugačije funkcioniranje mehanizma zamijećeno je i na temelju istraživanja poliploidije gdje autopoliploidi nastali u travama (Lundqvist, 1968) zadržavaju funkcionalnu samoinkompatibilnost, dok kod tipa *Solanaceae* SI gubi svoju svrhu. Osnova sustava s dva lokusa djeluje na način da barem jedan Z ili S alel u polenovom zrnu mora biti drugačiji kako bi polen bio kompatibilan. Očigledno je ponovljen GSI sistem gdje ne/interakcija produkata istih S ili Z alela eksprimiranih u polenu i tučku dovodi do sprječavanja oplodnje (Sl. 10).

Porodica *Poaceae* nije jedina skupina biljaka u kojoj je otkriven GSI kontroliran s više lokusa. Porodice *Liliaceae* (*Lilium martagon*), *Chenopodiaceae* (*Beta vulgaris*), i *Fabaceae* (*Lotus tenuis*), te većina reda *Ranunculales* gdje *Ranunculus spp.* posjeduje SI kontroliran čak četirima lokusima. U takvom sustavu oplodnja je moguća između bližih srodnika koji dijele i po tri alela. (Allen i Hiscock, 2008).

Evolucijski gledano primjeri poput *Ranunculus spp.* i općenito sustavi autosterilnosti kontrolirani s više alela smatraju se evolucijski starijom, „primitivnijom“ osobinom zato što povećavaju sličnost gena koje potomci mogu naslijediti promovirajući pritom homozigotnost, a ne adaptabilniju heterozigotnu jedinku. Proučavajući kladogram kritosjemenjača (Sl. 3.) možemo uočiti da su navedene porodice koje dijele ovakav tip SI-a svojim pretkom grupirane oko 20 milijuna godina ranije od hipotetskog pretka središnjih eudikotiledona.



Slika 10. Genetska osnova za mehanizam SI-a u *Poaceae*

U tučcima ne dolazi do oplodnje polenom ukoliko haplotip ne sadrži barem jedan S ili Z-alel drugačiji od genotipa tučka. Tako u prvom tučku genotipa $S_1S_2Z_1Z_2$ uopće nema oplodnje dok u posljednjem tučku zbog prisutnosti različitih S-alela sva polenova zrnca su kompatibilna (prikaz adaptiran iz Manzanares, 2013).

Kako su dva lokusa odgovorna za genetsko ispoljavanje samoinkompatibilnosti, moguća je oplodnja sa 75% polena proizvedenog u roditeljskom muškom sporofitu (dok kod pomoćnica i makova zbog kontrole samo S-lokusom moguća je oplodnja s 0, 50 i 100% uspješnosti).

Ženska i muška determinanta ovog mehanizma još su uvijek nepoznanica te se po određenim istraživanjima može samo nagađati o procesima koji sačinjavaju molekularni mehanizam. Slično kao i u porodice *Papaveraceae*, postoji signalna kaskada kalcijem i posljedična fosforilacija određenih proteina. Nedavno istraživanje navodi grupu genskih produkta S i Z-lokusa u tučku (receptorske protein kinaze, kalcij ovisne proteinske kinaze, ekspanzin, pektin-esteraze, peroksidazu i niz transkripcijskih faktora) u kojima bi mogla biti prisutna specifična ženska determinanta (Zhou i sur., 2014).

Trenutno se provodi iscrpno mapiranje gena S-lokusa, Z-lokusa i još dva T i F-lokusa za čije se ekspresije sumnja da sudjeluju u mehanizmu samoinkompatibilnosti trava.

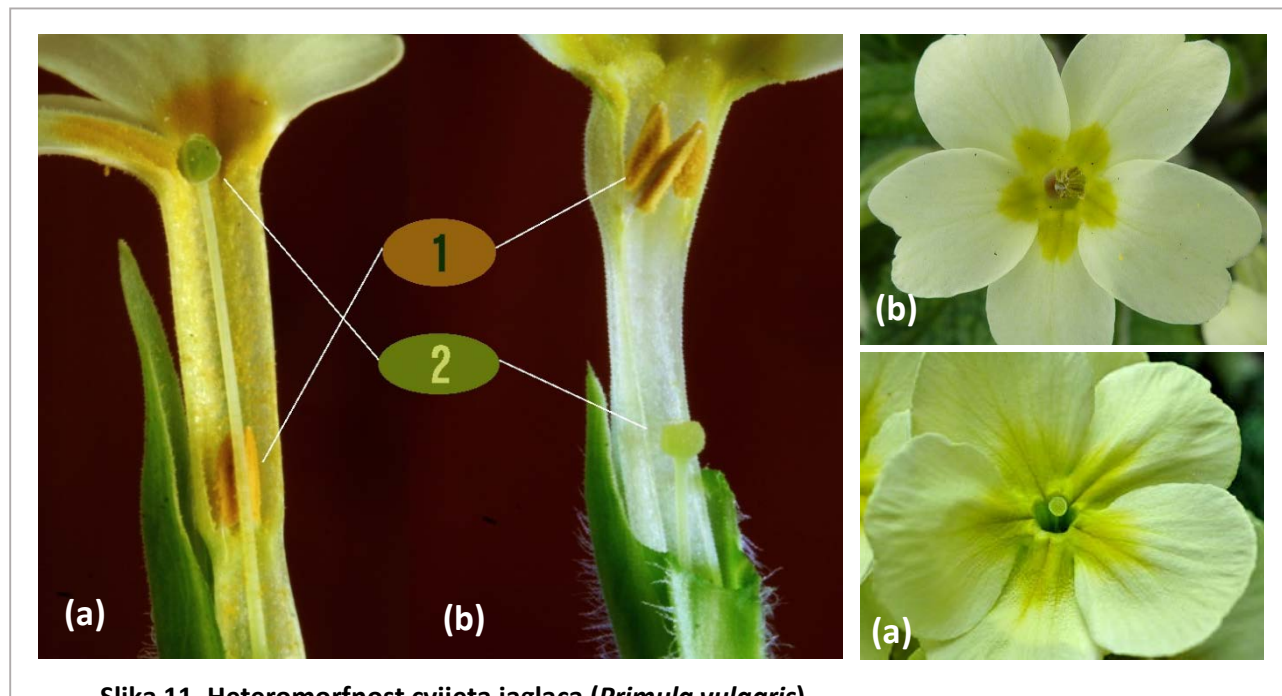
4. SPOROFITSKA SAMOINKOMPATIBILNOST

Sporofitska samoinkompatibilnost je sustav koji poput GSI-a koristi ekspresiju S-lokusa u postizanju autosterilnosti. Umjesto haplotipa koji determinira inkompatibilnost polena, ovdje tu ulogu preuzima genotip roditeljskog sporofita polena, te su odnosi S-alela u SSI-u uređeni po principu dominantno-recesivnih odnosa (Llaurens i sur., 2009).

SSI sustav je zamijećen kao evolucijski mlađa pojava u kritosjemenjača te ga nose porodice biljaka koje su svrstane na krajeve grana filogenetskih skupina (Sl. 3.). Iz takvog odnosa može se iščitati kako je GSI prethodnik SSI-a, no filogenetskim analizama nije pronađena potvrda da se SSI razvio iz GSI-a prvenstveno zbog izričitih razlika u funkcioniranju njihovih mehanizama (Allen i Hiscock, 2008).

Sporofitska samoinkompatibilnost dijeli se na dva tipa prema obliku cvijeta:

- (a) **Homomorfni SSI** – ne postoji morfološka razlika između biljaka koje stupaju u spolno razmnožavanje. Njihovi cvjetovi su međusobno identične morfologije.
- (b) **Heteromorfni SSI** – prisutna je morfološka razlika u izgledu cvjetova spolnih partnera (Sl. 11.) te je samo određena kombinacija povoljna za uspješnu oplodnju.



Slika 11. Heteromorfnost cvijeta jaglaca (*Primula vulgaris*)

Dva genetski determinirana morfološka oblika cvijeta jaglaca nastala su mikroevolucijskim procesom preadaptacije (mutacija uzrokuje novu osobinu).

- (a) Cvijet dugog vrata tučka (2) i kratkih filamenata prašnika (1).
- (b) Drugi oblik cvijeta s kratkim vratom i dugačkim filamentima (izvori slika: *digital botanic garden* i *commons wikimedia*).

4.1. MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI HOMOMORFNOG TIP A U PORODICI KRSTAŠICA

Homomorfni sustav SSI-a je polifiletsko svojstvo i tijekom evolucije kritosjemenjača pojavio se barem 17 puta (Igic i sur., 2008). Trenutačno, molekularni mehanizam SSI-a otkriva se u porodicama *Brassicaceae* (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*), *Asteraceae* (*Senecio squalidus*) i *Convolvulaceae* (*Ipomoea trifida*), gdje je najviše pažnje znanstvenika zauzeo *Brassicaceae* tip autosterilnosti koji je ujedno i nabolje istražen (Allen i sur., 2010; Kowiyama i sur., 2008; Indriolo i Goring, 2014). Kao i u gametofitskom SI-u, i ovdje su prisutni različiti tipovi mehanizma istog sustava, što ide u prilog argumentiranju homoplazije taksona.

U porodici krstašica (*Brassicaceae*), osnovni model odbacivanja inkompatibilnog polena temelji se na zaustavljanju hidratacije polenovih zrna nakon kontakta sa suhom površinom njuške tučka. Kao i u mnogim segmentima biljnog metabolizma glavni proces na kojem se temelji molekularni mehanizam *Brassicaceae* tipa je ubikvitinacija. Ovdje je ona inicirana na drugačiji način nego u ranije diskutiranom S-RNaznom mehanizmu. (Indriolo i Goring, 2014).

S-aleli u SSI-u uređeni su na temelju dominantno-recesivnih odnosa i po tome podijeljeni u dvije kategorije gdje je tzv. klasa I. dominantna u odnosu na klasu II. Dominacija se postiže na molekularnoj razini unutar tučka i antera koje proizvode polen.

4.1.1. ŽENSKA DETERMINANTA SRK

Otkriveno je da S-geni u tučku kod porodice *Brassicaceae* kodiraju za proteine **S-lokus glikoprotein (SLG)** (Hinata i Nishio, 1978) i **S-receptor kinaza (SRK)** (Stein i sur., 1991). SLG je glikoprotein veličine od 50-60 kD, dok je SRK transmembranski protein koji pored hidrofobne domene sadrži ekstracelularnu (S-domenu) koja nalikuje glikoproteinu SLG, i intracelularnu domenu koja posjeduje Ser/Thr kinaznu aktivnost (Takayama i Isogai, 2005). Oba proteina imaju visoku ekspresiju u epidermalnim stanicama njuške tučka. Istraživanjima je potvrđeno kako je protein SRK specifična ženska determinanta SI mehanizma, dok protein SLG kod nekih vrsta služi kao podrška i stabilizacija proteinu SRK i time povećava njegovu aktivnost. Kod nekih

vrsta kao npr. *A. thaliana* i *B. Oleracea* uopće nije prisutan (Schierup i sur., 2001; Suzuki i sur., 2000).

Proučavanjem odnosa dominacije u tučku nisu uočene promjene u ekspresiji recesivnog S-alela u usporedbi s dominantnim unutar heterozigotne jedinke. Time se pretpostavlja da osnova po kojoj je jedna ženska determinanta u nepovoljnijem položaju leži u samom proteinu SRK, tj. najvjerojatnije po njegovom manjem afinitetu vezanja muške determinante (Naithani i sur., 2007).

4.1.2. MUŠKA DETERMINANTA SCR/SP11

Kloniranjem i sekvenciranjem gena S-lokusa otkriven je mali, bazični protein bogat cisteinima i disulfidnim vezama koje stabiliziraju njegovu strukturu, nazvan **S-lokus protein 11 (SP11)**, tj. **S-lokus cistein bogat protein (SCR)**. Mutacije dobijka funkcije pokazale su kako SCR djeluje kao specifična muška determinanta *Brassicaceae* SI-a. Imunohistološkim metodama otkriveno je porijeklo proteina SCR koji potječu iz tkiva tapetuma roditeljske biljke polena. Tapetum je tkivo s nutritivnom funkcijom unutar antere koje ima važnu ulogu prilikom sporogeneze i formiranja polenovih zrnca. Tu se ulažu proteini SCR eksprimirani u stanicama tapetuma unutar šupljina eksine (vanjske stjenke polena građene od sporopolenina) (Iwano i sur., 2003).

Dominantno-recesivni odnosi S-alela proučeni su prilikom formiranja polena. Unutar heterozigotne jedinke recesivni alel neće eksprimirati svoje proteine u tapetumu antere, te će se u polenovu eksinu ugraditi samo proteinski produkti dominantnog alela (Kusuba i sur., 2002). Navedena spoznaja i utišanost recesivnog alela heterozigota događa se zbog *de novo* epigenetičke metilacije 5' promotorske sekvence koja se odvija unutar stanica tapetuma. Epigenetski proces događa se zbog male nekodirajuće molekule RNA koja je prepisana iz sekvence dominantnog S-alela (Tarutani i sur., 2010).

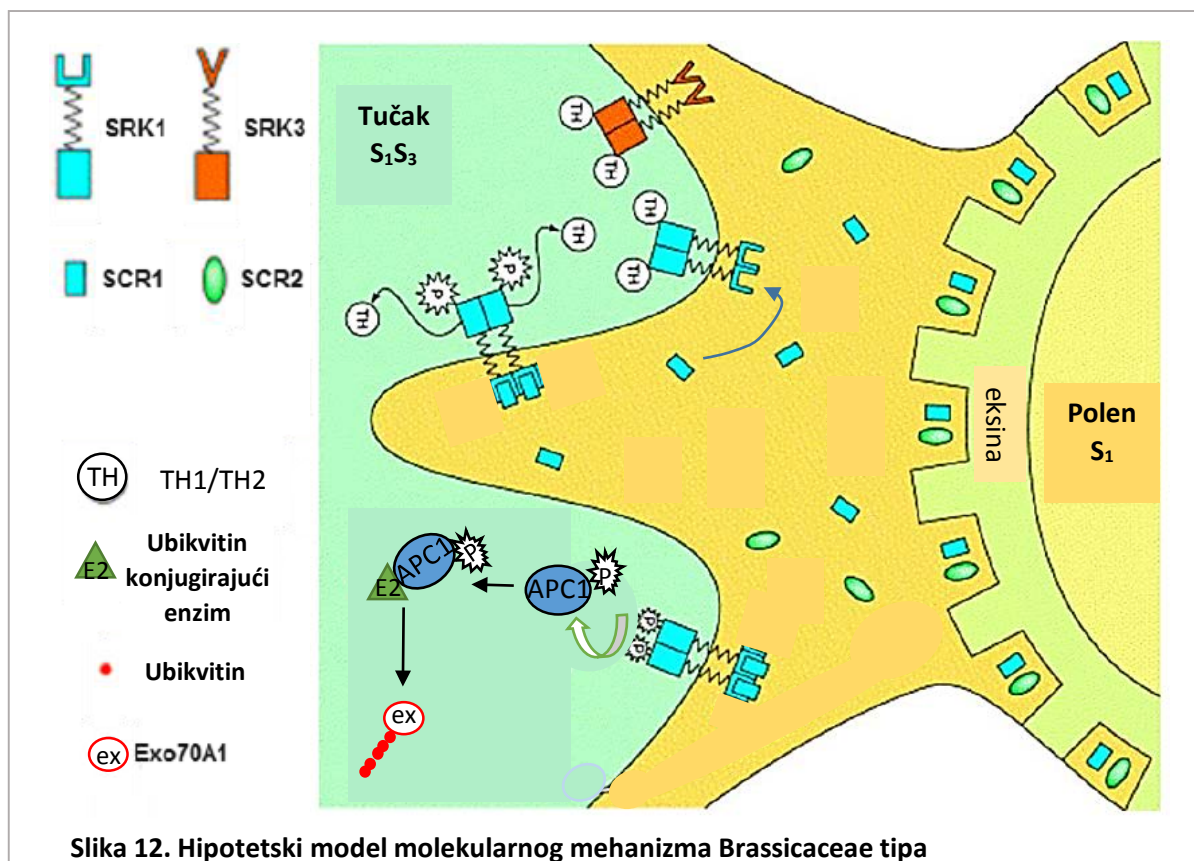
4.1.3. MOLEKULARNI MEHANIZAM AUTOSTERILNOSTI U PORODICE *Brassicaceae*

Početak molekularnog mehanizma podrazumijeva interakciju specifičnih determinanti SCR-a i SRK-a. Točan način njihovog međudjelovanja je nepoznat, no zasigurno je da vezanjem liganda na transmembransku žensku determinantu rezultira pokretanjem signalne kaskade. Otkriveno je da je na intercelularnu domenu s kinaznom aktivnosti ženske dominante stalno vezan represorski protein TH1 ili TH2 (Bower i sur., 1996). Nakon interakcije sa SCR-om

pokreće se signalna kaskada koja uključuje međudjelovanje triju proteina: **M-lokus proteinska kinaza (MLPK)**, **ARC1** (ubikvitin ligaza E3) i **Exo70A1** (proteinski kompleks uključen u egzocitozu) (Kitashiba i Nasrallah, 2014). MLPK ima nepoznatu funkciju u mehanizmu, a ostvaruje interakciju sa SRK-om, dok protein Exo70A1 reagira s ubikvitin ligazom ARC1.

Hipotetski model (Sl. 12.) započinje prepoznavanjem muške i ženske determinante na membrani epidermalne stanice gdje se potiče fosforilacija ARC1-a preko intercelularne domene proteina SRK-a i MLPK. Protein ARC1 će se fosforilacijom aktivirati i ubikvitinirati protein Exo70A1. Egzocitoza vezikula za hidrataciju polenove tube time je inhibirana (Samuel i sur., 2009). Nedavna istraživanja u lipnju prošle godine (Safavian i sur., 2014) potvrđuju ulogu Exo70A1 kao egzocitoznog regulatora gdje su u mutantama *A. thaliana* tog proteina iz nemoguće oplodnje uspjeli potaknuti rast polenove mješine s povećanjem vlage i hidratiziranjem polena.

Iako ovaj hipotetski model sabire trenutačna saznanja SI-a u porodici *Brassicaceae*, točna uloga MLPK kinaze i mnogih dijelova mehanizma nejasna je i neistražena.

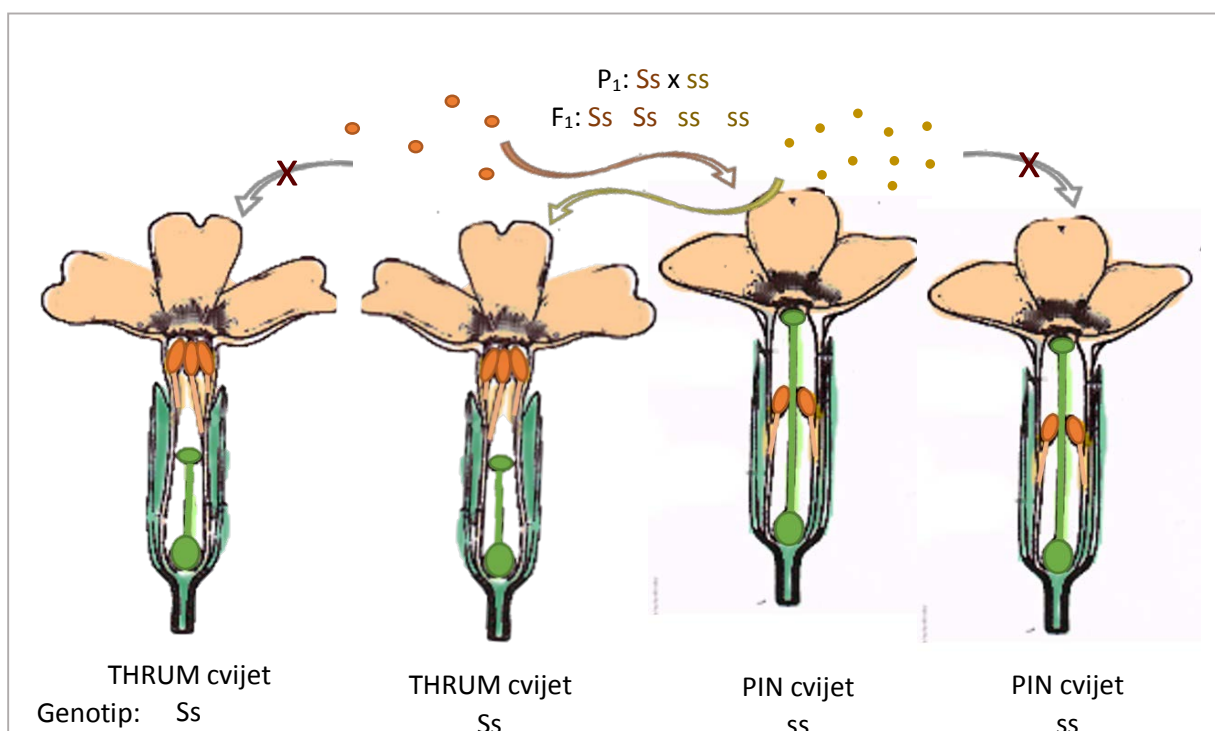


4.2. HETEROMORFNI TIP MEHANIZMA AUTOSTERILNOSTI U PORODICI JAGLACA

Heteromorfni tip SSI-a je slično kao i homomorfni polifiletsko svojstvo koje se razvilo neovisno oko 25 puta u različitim porodicama unutar podrazreda *Magnoliidae* (Sl. 3.). Ne postoji dokaz da se heteromorfni sustav razvio iz homomornog već je vjerojatnije da se heteromorfni tip SSI-a razvio neovisno.

Heterostilija je pojava dvaju ili više genetski kontroliranih morfizma cvijeta unutar iste biljne vrste. Tom pojavom u porodici *Primulaceae* (Sl. 11) bio je fasciniran Charles Darwin koji je u svojoj autobiografiji objavio citat: “Ništa u mojoj znanstvenoj karijeri nije mi dalo toliko zadovoljstva kao razumijevanje svrhe heteromornih cvijetova.” (Darwin i Barlow, 1993).

Heteromorfni SSI funkcionira na način da polen samo s jednog morfološkog oblika može oploditi drugi oblik (Sl. 13.). Dva oblika dvospolnog cvijeta jaglaca (*Primula vulgaris*) nazvana su **PIN** (narodno ženski cvijet) i **THRUM** (narodno muški cvijet) i razlikuju se u duljini vrata tučka i filamenata prašnika, obliku latica u vjenčiću, veličini polena i njegovoj produkciji.



Slika 13. Mogućnosti oprašivanja kod jaglaca

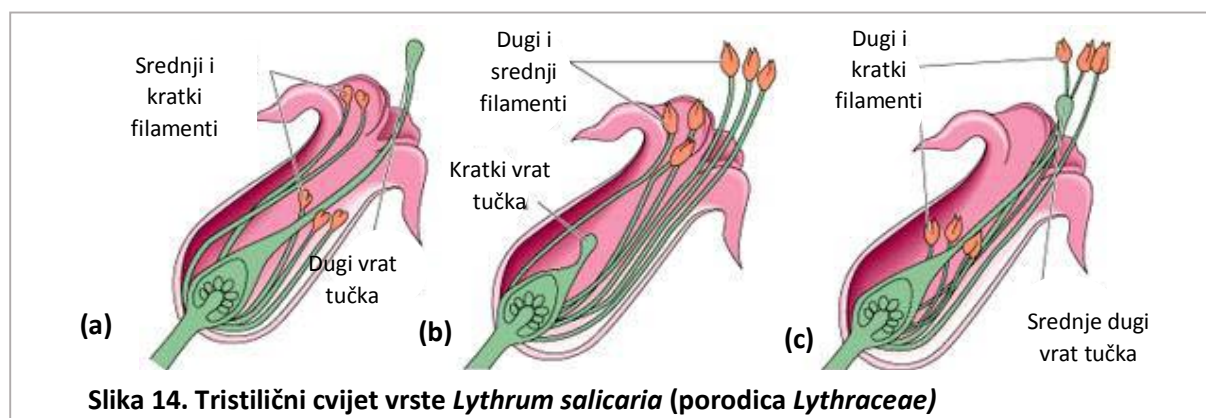
THRUM cvijet je heterozigot koji stvara polenova zrna s većim energetske potencijalom, no u manjoj količini. PIN cvijet nasuprot THRUM cvijeta stvara više manjih zrnaca polena. Oplodnja je moguća isključivo između THRUM i PIN cvijeta. Njihovo križanje i prva generacija potomaka prikazani su iznad crteža.

PIN cvijet je genotipom recesivni homozigot za S-lokus (ss), a THRUM heterozigot (Ss) čiji je fenotip određen dominantnim S-alelom. Istraživanja na tetraploidima prikazala su kako dominantni alel uvijek zasjeni recesivne (npr. Ssss) i time se u populacijama poliploida često sekundarno pojavljuje homostilija (Mast i Conti, 2006). Kod prirodno prisutnih jedinki koji su genotipno diploidni ovakav odnos održava stalnu populaciju okvirno istog broja morfoloških jedinki (50% PIN i 50% THRUM).

Vrsta *P. vulgaris* sadrži samo dva tipa S-alela unutar vrste, za razliku od gametofitskog SI-a s izrazito polimorfnim alelima. Sama morfologija nema direktnu ulogu u SI-u, no pretpostavlja se da su geni za oblik cvijeta u neposredoj blizini S-lokusa i time se nasljeđuju zajedno. Takva uska povezanost bez pojave rekombiniranih oblika objašnjena je pozicijom S-lokusa koji se nalazi u sub-centromernoj regiji gdje je crossing-over rijetka pojava (McCubbin, 2008).

Primamljivo je predložiti hipotezu kako se dominantno-recesivni odnos ostvaruje putem metilacije kao što je prikazano u porodici krstašica koja također dijeli sustav SSI, no zbog velikog broja istraživanja koja se bave makroevolucijskim procesima nastanka heterostilije, mikroevolucijska osnova pala je u drugi plan, pa time mehanizam autosterilnosti kao i osnove dominantno-recesivnog odnosa u porodici *Primulaceae* nisu razjašnjeni.

Primula vulgaris posjeduje distiliju (dva morfološka oblika cvijeta) dok je u drugih vrsta primjećena i tristilija tj. posjedovanje triju morfoloških oblika cvijeta. Za većinu tristiličnih vrsta pronađenih u porodicama *Oxalidaceae* i *Pontederiaceae* (Barrett, 1993) vrijedi isti princip oplodnje i interakcije dvaju S-alela kao i kod jaglaca, osim što postoji još jedan dodatni epistatični M-lokus (ponovno s dvama alelima) koji definira fenotip SI-a. Jedinstvena je osobina cvijeta da proizvodi dvije vrste prašnika, gdje svaki zasebno proizvodi određeni tip polena koji može oploditi druga dva morfološka oblika iste vrste (Barrett, 1992).



Slika 14. Tristilični cvijet vrste *Lythrum salicaria* (porodica *Lythraceae*)

Tri morfološka oblika cvijeta u pogledu na tip prašnika i duljinu njuške tučka (slika prilagođena iz izvora aminuranidwi.blogspot).

5. OSTALI SUSTAVI SAMOINKOMPATIBILNOSTI

Pored dvaju najviše istraživana sustava gametofitske i sporofitske samoinkompatibilnosti (homo i heteromorfno tipa) još su dva zamijećena sustava samoinkompatibilnosti u kritosjemenjača: kasna ovarijska i kriptična samoinkompatibilnost.

5.1. KRIPTIČNA SAMOINKOMPATIBILNOST

Među malo istraženim sustavima SI-a je i kriptična samoinkompatibilnost (CSI), gdje ne postoji kompletna inhibicija oplodnje inkompatibilnim polenom, već takva oplodnja rezultira nastankom manje oplođenih sjemenih zametaka nego što bi nastalo preferiranom oplodnjom s kompatibilnim polenom.

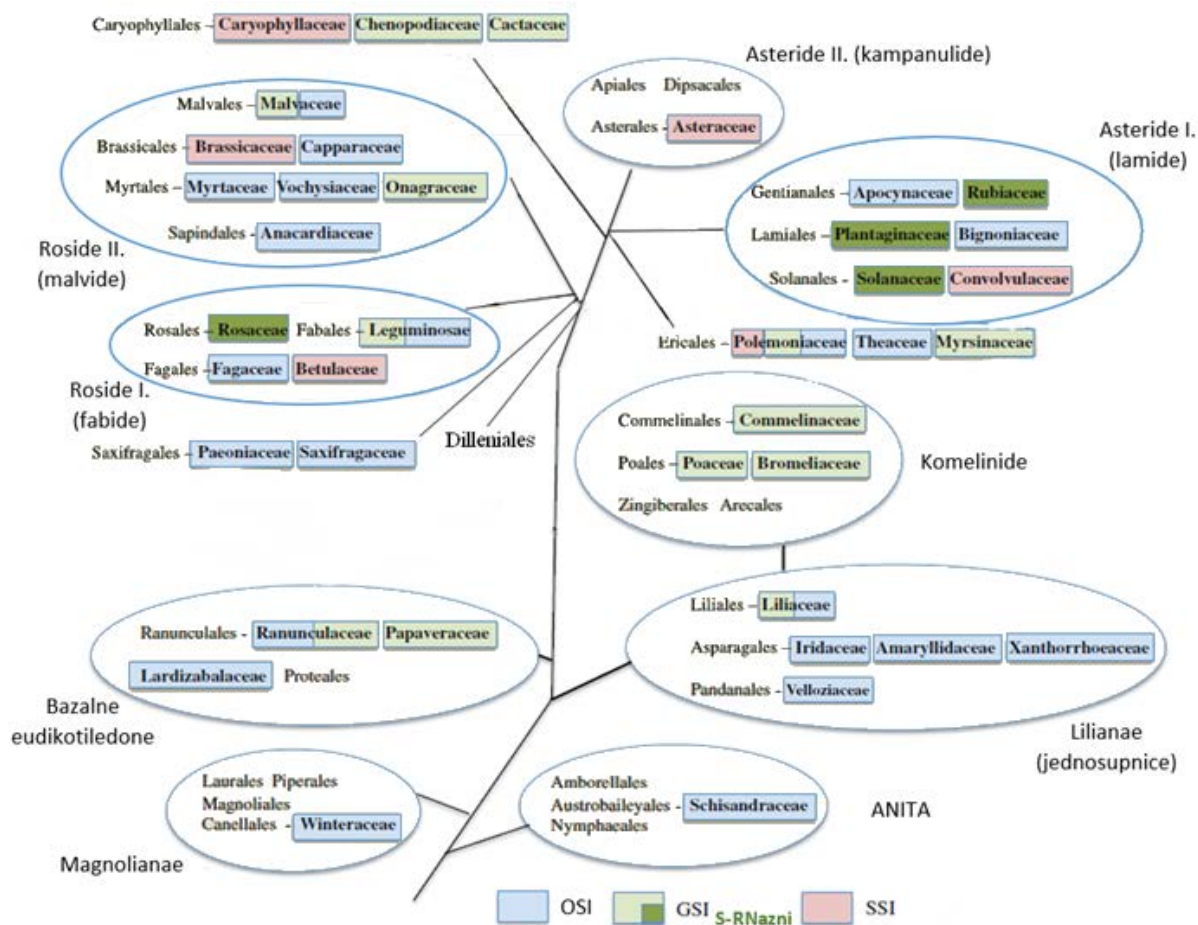
Neke vrste unutar svojih porodica posjeduju CSI kao npr. *Boraginaceae*, *Onagraceae*, *Campanulaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Liliaceae*, *Rubiaceae* i tristilični cvijetovi u *Lythraceae* (Weller i Ornduff, 1977; Jones, 1994; Kruszewski i Galloway, 2006; Eckert i Allen, 1997). Opažanje da se CSI najčešće javlja u heteromorfim vrstama čiji vrlo bliski srodnici posjeduju funkcionalni SSI heteromorfno tipa (Good-Avila i sur., 2008) navodi na potencijalno nova viđenja evolucije CSI-a.

5.2. KASNA OVARIJSKA SAMOINKOMPATIBILNOST

Kasna ovarijska samoinkompatibilnost (OSI) je sustav SI-a gdje se ne inhibira rast polenove mješnice već neposredno prije (prezigotno) ili nakon oplodnje (postzigotno) određenom malformacijom jajne stanice/zigote poništava se oplodnja nekompatibilnim haplotipom (Hao i sur., 2012).

OSI je prisutan u mnogim nesrodnim porodicama biljaka što upućuje na evolucijski neovisnu pojavu ovog sustava (Sl. 15.), a obilježava i bazalne (ANITA) porodice kritosjemenjača. Time možemo zaključiti kako je OSI prvobitni i najosnovniji sustav SI-a koji su kritosjemenjače mogle razviti u svojoj divergenciji.

Pretpostavke su da kasno ovarijski SI kontroliraju više genskih lokusa i da je genetička osnova poput gametofitskog sustava, no više detalja, molekularni mehanizam kao i način funkcioniranja ostaju neistraženi (Allen i Hiscock, 2008).



Slika 15. Komparativna filogenetička distribucija OSI, GSI i SSI sustava

Porodice i redovi kod kojih susrećemo OSI, GSI i SSI homomorfnog tipa prilikom čega su kod GSI-a i SSI-a uključene samo porodice gdje je istraživani S-lokus (prilagođeno na filogeniju APGIII sustava iz izvora Gibbs, 2014).

6. LITERATURA

- Allen, A. M., Lexer, C., Hiscock, S. J. (2010). Comparative Analysis of Pistil Transcriptomes Reveals Conserved and Novel Genes Expressed in Dry, Wet, and Semidry Stigmas. *Plant Physiol.* **154**: 1347–1360.
- Allen, A. M., Hiscock, S. J. (2008). Evolution and Phylogeny of Self-Incompatibility Systems in Angiosperms. *Self-Incompatibility in Flowering Plants Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer, Berlin, 72–101.
- aminuranidwi.blogspot - <http://aminuranidwi.blogspot.com/2010/05/heterostyly-pada-tumbuhan.html>
- APGIII - <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Barrett, S. C. H. (1993). The evolutionary biology of tristyl. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* **9**: 283-326.
- Barrett, S. C. H. (1992). Heterostylous Genetic Polymorphisms: Model Systems for Evolutionary Analysis. *Evolution and Function of Heterostyly*, Springer, Berlin 1-29.
- Baumann, U., Juttner, J., Bian, X. Y., Langridge, P. (2000). Self-incompatibility in the grasses. *Ann. Bot.* **85**: 203–209.
- Bernhardt, P., Sage, T., Weston, P., Azuma, H., Lam, M., Thien, L., Bruhl, J. (2003). The pollination of *Trimenia moorei* (*Trimeniaceae*): Floral volatiles, insect/wind pollen vectors, and stigmaticself-incompatibility in a basal angiosperm. *Ann. Bot.* **92**: 1–14.
- Bosch, M., Franklin-Tong, V. E. (2007). Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in Papaver pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 18327–18332.
- Bower, M. S., Matias, D. D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S. J., Goring, D. R. (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase. *Plant Cell* **8**: 1641-1650.
- Bredemeijer, G. M. M., Blaas, J. (1981). S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theor. Appl. Genet.* **33**: 215-225.
- Brewbaker, J. L. (1957) Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *J. Hered.* **48**: 271-277.
- common wikipedia - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Primula_vulgaris_ENBLA06_2.jpg
- Darwin, C., Barlow, N. (1993). *The Autobiography of Charles Darwin, 1809-1882: With Original Omissions Restored*. Norton
- de Graaf, B. H., Vatovec, S., Juárez-Díaz, J. A., Chai, L., Kooblall, K., Wilkins, K. A., Zou, H., Forbes, T., Franklin, F. C., Franklin-Tong, V. E. (2012). The Papaver self-incompatibility pollen S -determinant, PrpS, functions in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* **22**: 154–159.
- de Graaf, B. H. J., Rudd, J. J., Wheeler, M. J., Perry, R. M., Bell, E. M., Osman, K., Franklin, F. C. H., Franklin-Tong, V. E. (2006). Self-incompatibility in Papaver targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature* **444**: 490–493.
- de M. F. Suassuna, T., Bruckner C., Carvalho C., Borém A. (2003). Self-incompatibility in passionfruit: Evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 298–302.

- Heslop-Harrison, Y., Shivanna, K. (1977). The receptive surface of the Angiosperm stigma. *Ann. Bot.* **41**: 1233–1258.
- digital botanic garden - <http://digitalbotanicgarden.blogspot.com/2011/02/primrose-primula-vulgaris-primulaceae.html>
- Eckert, C., Allen, M. (1997). Cryptic self-incompatibility in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Am. J. Bot.* **84**: 1391-1397.
- Foot, H. C. C., Ride, J. P., Franklin-Tong, V. E., Walker, E. A., Lawrence, M. J., Franklin, F. C. H. (1994) Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 2265–2269.
- Franklin, F. C. H., Lawrence, M. J., Franklin-Tong, V. E. (1995). Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int. Rev. Cytol.* **158**: 1–64.
- Franklin-Tong, V. E. (2014). *Papaver rhoeas* S -Determinants and the Signaling Networks They Trigger. *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. Springer, Berlin, 273-287.
- Franklin-Tong, V. E., Ride, J. P., Read, N. D., Trewavas, A. J., Franklin, F. C. H. (1993). The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic-free calcium. *Plant J.* **4**: 163–177.
- Gibbs, P. E. (2014). Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. *New Phytol.* **203**: 717–734.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T. E., Cruz-Garcia, F., McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**: 805-810.
- Goodwillie, C. (1997). The genetic control of self-incompatibility in *Linanthus parviflorus* (Polemoniaceae). *Heredity* **79**: 424–432.
- Gray, J. E., McClure, B. A., Bonig, I., M. A. Anderson, Clarke, A. E. (1991). Action of the Style Product of the Self-Incompatibility Gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on in Vitro-Grown Pollen Tubes. *Plant Cell* **3**: 271–283.
- Hao, Y., Zhao, X., She, D., Xu, B., Zhang, D., Liao, W. (2012). The Role of Late-Acting Self-Incompatibility and Early-Acting Inbreeding Depression in Governing Female Fertility in Monkshood, *Aconitum kusnezoffii*. *PLoS One* **7**: e47034.
- Hinata, K., Nishio, T. (1978). S-allele specificity of stigma proteins in *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *Heredity* **41**: 93-100.
- Hiscock S., McInnis S. (2003). The diversity of self-incompatibility systems in flowering plants. *Plant. Biol.* **5**: 23–32.
- Hiscock S., Tabah D. (2003). The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**: 1037–1045.
- Igic, B., Lande, R., Kohn, J. R. (2008). Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *Int. J. Plant Sci.* **169**: 93-104.

- Indriolo, E., Goring, D. R. (2014). A conserved role for the ARC1 E3 ligase in *Brassicaceae* self incompatibility. *Front Plant Sci.* **5**: 181–195.
- Iwano, M., Shiba, H., Funato, M., Shimosato, H., Takayama, S., Isogai, A. (2003). Immunohistochemical Studies on Translocation of Pollen S-haplotype Determinant in Self-incompatibility of *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.* **44**: 428-436.
- Jones, K. N. (1994). Nonrandom Mating in *Clarkia gracilis* (*Onagraceae*): A Case of Cryptic Self-Incompatibility. *Am. J. Bot.* **81**: 195-198.
- Kao, T., Tsukamoto, T. (2004). The molecular and genetic bases of S-RNase-based selfincompatibility. *Plant Cell* **16**: 72 – 83.
- Kitashiba, H., Nasrallah, J. B. (2014). Self-incompatibility in *Brassicaceae* crops: lessons for interspecific incompatibility. *Breeding Sci.* **64**: 23–37.
- Kowyama, Y., Tsuchiya, T., Kakeda, K. (2008). Molecular Genetics of Sporophytic Self-Incompatibility in *Ipomoea*, a Member of the *Convolvulaceae*. *Self-Incompatibility in Flowering Plants Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer, Berlin, 259–274.
- Kruszewski, L. J., Galloway, L. F. (2006). Explaining Outcrossing Rate in *Campanulastrum americanum* (*Campanulaceae*): Geitonogamy and Cryptic Self-Incompatibility. *Int. J. Plant Sci.* **167**: 455-461.
- Kusaba, M., Tung, C. W., Nasrallah, M. E., Nasrallah, J. B. (2002). Monoallelic expression and dominance interactions in anthers of self-incompatible *Arabidopsis lyrata*. *Plant Physiol.* **128**: 17–20.
- Li, S., Franklin-Tong, V. E. (2008). Self-incompatibility in *Papaver*: A MAP kinase signals to trigger programmed cell death. *Plant Signal. Behav.* **3**: 243-245.
- Llaurens, V., Billiard, S., Castric, V., Vekemans, X. (2009). Evolution of dominance in sporophytic self-incompatibility systems: I. Genetic load and coevolution of levels of dominance in pollen and pistil. *Evolution* **63**: 2427–2437.
- Lundqvist, A. (1968). The mode of origin of self-fertility in grasses. *Hereditas* **59**: 413-426.
- Manzanares, C. (2013). Genetics of self-incompatibility in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Ph. D. thesis, University of Birmingham.
- Mast, A. R., Conti, E. (2006). The primrose path to heterostyly. *New Phytol.* **171**: 439–442.
- McClure, B., Cruz-García, F., Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann. Bot.* **108**: 647–658.
- McClure, B., Franklin-Tong, V. E. (2006). Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta* **224**: 233–245.
- McClure, B., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., Clarke, A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955–957.
- McCubbin, A. (2008). Heteromorphic Self-Incompatibility in *Primula*: Twenty-First Century Tools Promise to Unravel a Classic Nineteenth Century Model System. *Self-Incompatibility in Flowering Plants Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer, Berlin, 289–308.

- Meng, D., Gu, Z., Yuan, H., Wang, A., Li, W., Yang, Q., Zhu, Y., Li, T. (2014). The Microtubule Cytoskeleton and Pollen Tube Golgi Vesicle System are Required for in Vitro S-RNase Internalization and Gametic Self-Incompatibility in Apple. *Plant Cell Physiol.* **55**: 977-989.
- Naithani, S., Chookajorn, T., Ripoll, D. R., Nasrallah, J. B. (2007). Structural modules for receptor dimerization in the S-locus receptor kinase extracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 12211–12216.
- Newbigin, E., Anderson, M. A., Clarke, A. E. (1993). Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *Plant Cell* **5**: 1315–1324.
- Nikolić, T. (2013a): *Sistematska botanika – Raznolikost i evolucija biljnog svijeta*. Alfa d.d., Zagreb, 334–347.
- Nikolić, T. (2013b): *Sistematska botanika – Raznolikost i evolucija biljnog svijeta*. Alfa d.d., Zagreb, 516, 671.
- Nowak, M. D., Davis, A. P., Anthony, F., Yoder, A. D. (2011). Expression and Trans-Specific Polymorphism of Self-Incompatibility RNases in *Coffea (Rubiaceae)*. *PLoS One* **6**: e21019.
- Poulter, N. S., Vatovec, S., Franklin-Tong, V. E. (2008). Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in *Papaver* pollen. *Plant Physiol.* **146**: 1358–1367.
- Puerta, A. R., Ushijima, K., Koba, T., Sassa, H. (2009). Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *J. Exp. Bot.* **60**: 1309–1318.
- Safavian, D., Jamshed, M., Sankaranarayanan, S., Indriolo, E., Samuel, M. A., Goring, D. R. (2014). High humidity partially rescues the *Arabidopsis thaliana* *exo70A1* stigmatic defect for accepting compatible pollen. *Plant Reprod.* 10.1007/s00497-014-0245-z.
- Sage T., Sampson F. (2003). Evidence for ovarian self-incompatibility as a cause of self-sterility in the primitive woody angiosperm, *Pseudowintera axillaris (Winteraceae)*. *Ann. Bot.* **91**: 1–10.
- Samuel, M. A., Chong, Y. T., Haasen, K. E., Aldea-Brydges, M. G., Stone, S. L., Goring, D. R. (2009). Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at *Exo70A1*, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell* **21**: 2655–2671.
- Scalone, R., Albach, D. (2014). Cytological evidence for gametophytic self-incompatibility in the genus *Veronica*. *Turk. J. Bot.* **38**: 197–201.
- Schierup, M. H., Mable, B. K., Awadalla, P., Charlesworth, D. (2001). Identification and characterization of a polymorphic receptor kinase gene linked to the self-incompatibility locus of *Arabidopsis lyrata*. *Genetics* **158**: 387-399.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., Kao, T-h. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**: 302-305.
- Sims, T. L. (2012). Protein Interactions in S-RNase-Based Gametophytic Self-Incompatibility. *Protein Interactions*, InTech, 172-194.

- Snowman, B. N., Kovar, D. R., Shevchenko, G., Franklin-Tong, V. E., Staiger, C. J. (2002). Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell* **14**: 2613–2626.
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., Nasrallah, J. B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8816–8820.
- Suzuki, T., Kusaba, M., Matsushita, M., Okazaki, K., Nishio, T. (2000). Characterization of Brassica S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein. *FEBS Lett.* **482**: 102–108.
- Takayama, S., Isogai, A. (2005). Self-Incompatibility in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 467–489.
- Tangmitcharoen, S., Owens, J. N. (1997). Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in Teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *Ann. Bot.* **80**: 401–410.
- Tarutani, Y., H. Shiba, M. Iwano, T. Kakizaki, G. Suzuki, M. Watanabe, A. Isogai, S. Takayama (2010). Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility. *Nature* **466**: 983–987.
- Weller, S. G., Ornduff, R. (1977). Cryptic Self-Incompatibility in *Amsinckia grandiflora*. *Evolution* **31**: 47–51.
- Wheeler, M. J., de Graafa, B. H. J., Hadjosifa, N., Perry, R. M., Poulter, N. S., Osman, K., Vatovec, S., Harper, A., Franklin, F. C. H., Franklin-Tong, V. E. (2009). Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* **459**: 992–995.
- Whitehouse, H. (1950). Multiple allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of angiosperms. *Ann. Bot.* **14**: 199–216.
- Wu, J., Wang, S., Gu, Y., Zhang, S., Publicover, S. J., Franklin-Tong, V. E. (2011). Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* activates nonspecific cation conductance permeable to Ca^{2+} and K^{+} . *Plant Physiol.* **155**: 963–973.
- Xu, C., Li, M., Wu, J., Guo, H., Chai, J., Li, T., Li, Q., Zhang, Y., Xue, Y. (2014). Identification of a canonical SCF(SLF) complex involved in S-RNase-based self-incompatibility of *Pyrus* (*Rosaceae*). *Plant. Mol. Biol.* **81**: 245–257.
- Xue, Y., Liu, W., Fan, J., Li, J., Song, Y., Li, Q., Zhang, Y. (2014). SCF^{SLF}-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Front. Genet.* **5**, 00228.
- Yang, B., Thorogood, D., Armstead, I., Barth, S. (2008). How far are we from unravelling self-incompatibility in grasses? *New Phytol.* **179**: 740–753.
- Zhou, Q., Jia, J., Huang, X., Yan, X., Cheng, L., Chen, S., Li, X., Peng, X., Liu, G. (2014). The large-scale investigation of gene expression in *Leymus chinensis* stigmas provides a valuable resource for understanding the mechanisms of *Poaceae* self-incompatibility. *BMC Genomics* **15**: 399–412.

7. SAŽETAK

Samoinkompatibilnost je najvažniji mehanizam sprječavanja samooplodnje u kritosjemenjača. Genetički je kontrolirana najčešće jednim S-lokusom multialelnog tipa čija se ekspresija razlikuje unutar tkiva tučka i polena. Takvi tkivno specifični proteinski produkti istog S-alela stupaju u interakciju i pokreću mehanizam autosterilnosti. Najčešći sustavi SI-i su gametofitski (GSI) i sporofitski (SSI) sustav dok među ostale ubrajamo kasno ovarijsku (OSI) i kriptičnu samoinkompatibilnost (CSI).

Detaljnije su proučena tri molekularna mehanizma: S-RNazni (*Solanaceae* tip), kalcijev kaskadni (*Papaveraceae* tip) i SSI homomorfnog tipa u porodici *Brassicaceae*.

S-Rnazni mehanizam je najviše istraživani tip SI-a, no i dalje je upitan njegov točan način funkcioniranja. Iz svih informacija može se zaključiti kako su dva predložena modela najvjerojatnije povezana. Ubikvitinacijom se ostvaruje direktna degradacija ribonukleaza u citoplazmi dok se njihov endocitozni ulaz preusmjerava u vakuolu. Buduća istraživanja bi se trebala posvetiti predloženoj hipotezi kao i točnom mjestu citotoksične aktivnosti S-RNaza.

Papaveraceae tip jedan je od najpotpunijih mehanizama gdje je većina interakcija poznata, a novootkrivena pojava indukcije SI odgovora u nesrodnim biljkama nudi nove mogućnosti u agronomskoj primjeni i genetičkim istraživanjima.

Kroz ovaj rad prikazana je većina dosadašnjih saznanja u polju samoinkompatibilnosti te je uočljivo da mnogi segmenti tog polja čak i nakon 60 godina istraživanja ostaju neistraženi. Međudjelovanje više lokusa u jednosupnica, zanimljiva pojava heterostilije jaglaca i ostali sustavi SI-a svojim dubljim istraživanjem pružaju mogućnost važnih informacija za filogeniju, a time i detaljnije objašnjenje evolucijskih procesa koji su doprinijeli nevjerojatnoj divergenciji kritosjemenjača.

8. SUMMARY

Self-incompatibility is one of the most crucial mechanism to prevent inbreeding in angiosperms. It is genetically controlled with one multiallelic S-locus whose expression depends on pistil or pollen tissue. The most spread auto-sterility systems in angiosperms consists of two types of SI: gametophytically (GSI) or sporophytically (SSI) controlled self-incompatibility. The rest of SI noticed in angiosperms are cryptic (CSI) and late ovarian (OSI).

Three molecular mechanisms have been closely observed: S-RNase system (present in *Solanaceae*), calcium cascade system (present in *Papaveraceae*) and homomorphic SI type in *Brassicaceae* family.

After 60 years of intensive scientific research, our knowledge of molecular mechanisms of self-incompatibility is still incomplete. Even the most researched S-RNase mechanism remains questionable. From all of the information presented in this review, it can be concluded that the two proposed models are most likely related. Ubiquitination targets ribonucleases while most of them which enter the cell through endocytosis are sealed off from the cytoplasm in the vacuole. The most important suggestion for future research is to set the point of interest in connecting these two models and test this hypothesis, as well as look into the exact location of cytotoxic activities of S-RNases.

Papaveraceae type is one of the most researched mechanisms and most of its interactions are well-known. The newly discovered phenomenon where scientists managed to induce SI in a completely unrelated plant species opens up new possibilities for agronomical application and genetic research.

The focus of this paper is to deliver current information on the topic of self-incompatibility, even though most of SI mechanisms are still poorly documented in the majority of plant families. Deeper study of this problem would offer valuable information for phylogeny and better explanation of evolutionary processes of angiosperms.